

Docket No. 0163-0758-0X

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: RYUICHIRO KURANE ET AL

GAU:

SERIAL NO: NEW APPLICATION

EXAMINER:

FILED: HEREWITH

FOR: METHOD FOR DETERMINING A CONCENTRATION OF TARGET NUCLEIC ACID MOLECULES, NUCLEIC ACID PROBES FOR THE METHOD, AND METHOD FOR ANALYZING DATA OBTAINED BY THE METHOD

REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS  
WASHINGTON, D.C. 20231

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

COUNTRY

APPLICATION NUMBER

MONTH/DAY/YEAR

JAPAN

11-111601

APRIL 20, 1999

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .  
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and  
(B) Application Serial No.(s)
- ☐ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.

Norman F. Oblon  
Registration No. 24,618

Daniel J. Pereira, Ph.D.  
Registration No. 45,518

Fourth Floor  
1755 Jefferson Davis Highway  
Arlington, Virginia 22202  
Tel. (703) 413-3000  
Fax. (703) 413-2220  
(OSMMN 11/98)



日 本 国 特 許 庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

JC542 U.S. PTO  
09/556127  
04/20/00

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 4月20日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第111601号

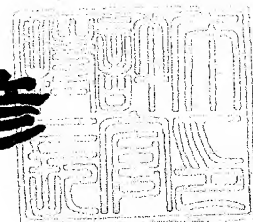
出 願 人  
Applicant (s):

財団法人 バイオインダストリー協会  
工業技術院長  
環境エンジニアリング株式会社

2000年 3月10日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特2000-3014749

【書類名】 特許願

【整理番号】 EN1221

【提出日】 平成11年 4月20日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12Q 1/00  
C12Q 1/64

【発明の名称】 核酸プロープを用いた核酸の新規測定方法

【請求項の数】 4

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術院生命工学工  
業技術研究所内

【氏名】 倉根 隆一郎

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術院生命工学工  
業技術研究所内

【氏名】 金川 貴博

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術院生命工学工  
業技術研究所内

【氏名】 鎌形 洋一

【発明者】

【住所又は居所】 東京都千代田区東神田1-9-8 環境エンジニアリン  
グ株式会社内

【氏名】 蔵田 信也

【発明者】

【住所又は居所】 東京都千代田区東神田1-9-8 環境エンジニアリン  
グ株式会社内

【氏名】 山田 一隆

【発明者】

【住所又は居所】 東京都千代田区東神田 1-9-8 環境エンジニアリング株式会社内

【氏名】 横幕 豊一

【発明者】

【住所又は居所】 東京都千代田区東神田 1-9-8 環境エンジニアリング株式会社内

【氏名】 小山 修

【発明者】

【住所又は居所】 東京都千代田区東神田 1-9-8 環境エンジニアリング株式会社内

【氏名】 古庄 健太

【特許出願人】

【住所又は居所】 東京都中央区八丁堀二丁目 26 番 9 号

【氏名又は名称】 財団法人バイオインダストリー協会

【特許出願人】

【識別番号】 000001144

【氏名又は名称】 工業技術院長 佐藤 壮郎

【特許出願人】

【識別番号】 000156581

【氏名又は名称】 環境エンジニアリング株式会社

【指定代理人】

【識別番号】 220000404

【氏名又は名称】 工業技術院生命工学工業技術研究所長 大箸 信一

【代理関係の特記事項】 特許出願人 工業技術院長の指定代理人

【代理人】

【識別番号】 100077698

【弁理士】

【氏名又は名称】 吉田 勝広

特平 11-111601

【代理関係の特記事項】 特許出願人 環境エンジニアリング株式会社及び  
特許出願人 財団法人バイオインダストリー協会の代理  
人

【復代理人】

【識別番号】 100077698

【弁理士】

【氏名又は名称】 吉田 勝広

【代理関係の特記事項】 特許出願人 工業技術院長の復代理人

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 010135

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9717259

【包括委任状番号】 9812328

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 核酸プローブを用いた核酸の新規測定方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 蛍光色素で標識された核酸プローブを用いる核酸測定方法において、当該プローブを標的核酸にハイブリダイゼーションさせ、ハイブリダイゼーション前後における蛍光色素の発光の減少量を測定することを特徴とする核酸の新規測定方法。

【請求項 2】 蛍光色素が、テトラメチルローダミン (tetramethylrhodamine) もしくはその誘導体、ボデピー (BODIPY) FL、ボデピー (BODIPY) R6G、ボデピー (BODIPY) TMR、またはボデピー (BODIPY) TRである請求項 1 に記載の核酸の新規測定方法。

【請求項 3】 標的核酸が、純粋分離して得た微生物由来、もしくは動物由来である請求項 1 または 2 に記載の核酸の新規測定方法。

【請求項 4】 標的核酸が、複合微生物系、あるいは共生微生物系の細胞内もしくは細胞のホモジネートの核酸である請求項 1 または 2 に記載の核酸の新規測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、蛍光色素で標識された核酸プローブを用いた核酸測定方法に関する。詳しくは、蛍光色素で標識された核酸プローブを標的核酸にハイブリダイゼーションさせたときに生ずる、ハイブリダイゼーション前後における蛍光色素の発光の減少量を測定する核酸の新規測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

従来、蛍光色素で標識された核酸プローブを用いて核酸量を測定する方法がある。該方法は、ドットブロッキング法といわれるもので、標的核酸と当該核酸プローブをメンブラン上でハイブリダイゼーションさせた後、未反応の核酸プローブ

ブを洗い流し、標的核酸とハイブリダイゼーションした核酸プローブに標識された蛍光分子のみの蛍光強度を測定するものである。

【0003】

この方法は、現在もっとも一般的に使用されるようになったものであるが、最終のデータを得るまで、少なくとも3日を必要とする。微生物の培養系、特に複合微生物系培養において特定菌株の生育を制御するために特定菌株の核酸量を測定する場合には、この方法は、時間が掛かり過ぎるという理由で利用できないでいた。そこで、このような系においても、便利に利用できる核酸測定方法の開発が望まれていた。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、前記の状況に鑑み、蛍光色素で標識された核酸プローブを用いる核酸測定方法において、より短時間に、かつより簡便に目的の核酸量を測定できる方法を提供することである。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、前記課題を解決するにあたり、核酸プローブを用いた核酸測定方法について検討を重ねた。その結果、蛍光色素で標識された核酸プローブが標的核酸にハイブリダイゼーションしたときに、蛍光色素の発色量が減少するという現象、更に特定の色素においてはその減少が顕著であるということを見出した。本発明はかかる発見に基づいて完成されたものである。

【0006】

すなわち、1) 本発明は、蛍光色素で標識された核酸プローブを用いる核酸測定方法において、当該プローブを標的核酸にハイブリダイゼーションさせ、ハイブリダイゼーション前後における蛍光色素の発光の減少量を測定することを特徴とする核酸の新規測定方法を提供する。また、

2) 本発明は、蛍光色素が、テトラメチルローダミン (tetramethylrhodamine) もしくはその誘導体、ボデピー (BODIPY) FL、ボデピー (BODIPY) R6G、ボデピー (BODIPY) TMR、またはボデピー (BODIPY) TRである前記1) に記載の核酸

の新規測定方法を提供する。また、

3) 標的核酸が、純粋分離して得た微生物由来、若しくは動物由来である核酸の前記1) または2) に記載の核酸の新規測定方法を提供する。さらに、

4) 本発明は、標的核酸が、複合微生物系、あるいは共生微生物系の細胞内もしくは細胞のホモジネートなどの核酸である前記1) または2) に記載の核酸の新規測定方法を提供する。

【0007】

【発明の実施の形態】

次に好ましい実施の形態を挙げて本発明を更に詳細に説明する。

本発明の特徴は、蛍光色素で標識された核酸プローブを用いる核酸測定方法において、当該核酸プローブが標的核酸にハイブリダイゼーションしたときに生ずる、ハイブリダイゼーション前後における蛍光色素の発光量の減少を測定することにある。

【0008】

蛍光色素で標識された核酸プローブを用いる核酸測定方法は、現在一般的に用いられるようになった核酸測定方法であり、例えば、メンブランフィルターを用いるドットプロット法などを挙げることができる。

【0009】

これらの方法では、蛍光色素で標識された核酸プローブを加えた後、標的核酸にハイブリダイゼーションしなかった未反応の当該核酸プローブの蛍光色素を測定系から洗浄などの方法で除去し、残存した蛍光量を測定する方法である。本発明はこのような複雑な操作をしないでも目的核酸を測定することに特徴がある。

【0010】

本発明における蛍光色素とは、一般に核酸プローブに標識して、核酸の測定・検出に使用する蛍光色素のこと。例えば、フルオレセイン (fluorescein) またはその誘導体 (例えば、フルオレセインイソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate) (FITC) など、ボデピー (BODIPY) FL (商標名; モレキュラー・プローブ (Molecular Probes) 社製、米国)、EDANS (5-(2'-aminoethyl) amino-1-naphthalene sulfonic acid)、ローダミン (rhodamine) 6G (R6G) または



その誘導体（例えば、テトラメチルローダミン（teramethylrhodamine）（TMR）、テトラメチルローダミンイソチオシアネート（tetramethylrhodamine isothiocyanate）（TMRITC）、ボデピー（BODIPY）R6G（商標名；モレキュラー・プローブ（Molecular Probes）社製、米国）、ボデピー（BODIPY）TMR（商標名；モレキュラー・プローブ（Molecular Probes）社製、米国）、およびテキサスレッド（Texas Red）またはその誘導体（例えば、ボデピー（BODIPY）TR（商標名；モレキュラー・プローブ（Molecular Probes）社製、米国）などを挙げることができる。これらの中でも、FITC、EDANS、BODIPY FL、BODIPY R6G、BODIPY TMR、BODIPY TRなどを好適なものとして、また、BODIPY FLをより好適なものとして挙げることができる。

#### 【0011】

核酸プローブおよびハイブリダイゼーションとは、現在、分子生物学、遺伝子工学などで使用されている用語と同じ意味である。本発明における核酸プローブはオリゴヌクレオチドからなるものである。また、核酸とは、DNA、RNA、デオキシリボオリゴヌクレオチド、リボオリゴヌクレオチドのことをいう。また、2'-*o*-Methyl Oligoribonucleotideのような修飾されたRNAも含む。本発明の対象と成る核酸は、これらの核酸が混在していてもよく、また、タンパク質が混在してもよい。また、細胞の中に存在していてもよい。細胞は真核細胞、原核細胞を問わない。また、細胞は種々の細胞が混在していてもよい。

#### 【0012】

標的核酸にハイブリダイゼーションさせる核酸プローブは、デオキシリボオリゴヌクレオチドで構成されていてもよいし、リボオリゴヌクレオチドで構成されていてもよい。また、2'-*o*-Methyl Oligoribonucleotideのような修飾されたRNAでもよい。そしてその塩基数は5～50であり、好ましくは10～25、特に好ましくは15～20である。50以上の場合は細胞膜の透過性が悪くなり、本発明の適用範囲を狭めることになる。5以下の場合、非特異的ハイブリダイゼーションが惹起し易くなり、測定誤差が大きくなる。

#### 【0013】

本発明における核酸プローブのオリゴヌクレオチドは、通常の一般的オリゴヌ

クレオチドの製造方法で製造できる。例えば、化学合成法、プラスミドベクター、ファージベクターなどを使用する微生物法などで製造できる (Tetrahedron Letter, 22巻、1859~1862頁、1981年、Nucleic acids Research, 14巻、6227~6245頁、1986年)。なお、現在、市販されている核酸合成機を使用するのが好適である (例えば、ABI394(Perkin Elmer社製))。

【0014】

オリゴヌクレオチドに蛍光色素を標識するには、通常の一般的標識法で行なうことができる (Nature Biotechnology, 14巻、303~308頁、1996年; Applied and Environmental Microbiology, 63巻、1143~1147頁、1997年; Nucleic acids Research, 24巻、4532~4535頁、1996年)。例えば、5'末端に蛍光色素分子を結合させる場合は、先ず、常法に従って5'末端にスペーサーとして $-(CH_2)_n-SH$ を導入する。これらの導入体は市販されているので市販品を購入してもよい (メドランド・サーレファイ・レージント・カンパニー (Midland Certified Reagent Company))。この場合、 $n$ は3~8、好ましくは6である。このスペーサーにSH基反応性を有する蛍光色素またはその誘導体を結合させることにより合成できる。このようにして合成された蛍光色素で標識されたオリゴヌクレオチドは、逆相などのクロマトグラフィーなどで精製して本発明で使用する核酸プローブとすることができる。

【0015】

また、オリゴヌクレオチドの3'末端に蛍光色素を結合させることもできる。この場合は、リボースまたはデオキシリボースの3'位CのOH基にスペーサーとして $-(CH_2)_n-NH_2$ を導入する。これらの導入体も前記と同様にして市販されているので市販品を購入してもよい (メドランド・サーレファイ・レージント・カンパニー (Midland Certified Reagent Company))。この場合、 $n$ は3~8、好ましくは4~7である。このスペーサーにアミノ基反応性を有する蛍光色素またはその誘導体を結合させることにより合成できる。このようにして合成された蛍光色素で標識されたオリゴヌクレオチドは、逆相などのクロマトグラフィーなどで精製して本発明で使用する核酸プローブとすることができる。このアミノ基を導入する場合、キット試薬 (例えば、Uni-link aminodododecylate (C

LONTECH社製、米国)、フルオ・リポターキット (FluoReporter Kits) F-6082、F-6083、F-6084、F-10220 (いずれもモレクキュラー・プローベ社製、米国))を用いるのが便利である。そして、常法に従って当該リポオリゴヌクレオチドに蛍光色素分子を結合させることができる。また、プローブ核酸の鎖内に修飾することも可能である (ANALYTICAL BIOCHEMISTRY 225, 32-38頁(1998年))。

【0016】

前記した核酸プローブを使用することで、本発明により目的の核酸(以下、標的核酸という。)を短時間で、簡便かつ特異的に測定することができる。以下に測定法を述べる。

本発明の測定方法において、先ず、測定系に前記の核酸プローブを添加し、標的核酸にハイブリダイゼーションさせる。その方法は、通常の既知方法で行なうことができる (Analytical Biochemistry, 183巻、231~244頁、1989年; Nature Biotechnology, 14巻、303~308頁、1996年; Applied and Environmental Microbiology, 63巻、1143-1147頁、1997年)。例えば、ハイブリダイゼーションの条件は、塩濃度は0~2モル濃度、好ましくは0.1~1.0モル濃度、pHは6~8、好ましくは6.5~7.5である。

【0017】

温度は、前記核酸プローブと標的核酸の特異的部位にハイブリダイゼーションしたハイブリダイゼーション物の $T_m$ 値 $\pm 10^\circ\text{C}$ の温度である。このようにすることにより非特異的なハイブリダイゼーションを防止することができる。 $T_m - 10^\circ\text{C}$ 未満のときは、非特異的ハイブリダイゼーション起こり、 $T_m + 10^\circ\text{C}$ を越えるときは、ハイブリダイゼーションが起こらない。なお、 $T_m$ 値は本発明で用いる核酸プローブを設計する実験において求めることができる。当該核酸プローブとハイブリダイゼーションする相補配列のオリゴヌクレオチドを核酸合成機などで化学合成し、当該核酸プローブとのハイブリダイゼーション物の $T_m$ 値を通常の方法で測定する。

【0018】

また、その反応時間は1秒間~180分間、好ましくは5秒間~90分間である。1秒間未満のときは、ハイブリダイゼーションにおいて未反応の本発明の核

酸プローブが多くなる。また、反応時間を余り長くしても特に意味がない。

前記のようにして、本発明において核酸プローブを標的核酸にハイブリダイゼーションさせる。そして、ハイブリダイゼーションの前後で、蛍光色素の発光量を蛍光光度計で測定し、発光の減少量を計算する。その減少量の大きさは核酸量と比例するので、標的核酸の量を求めることができる。

#### 【0019】

本発明の核酸測定法は、色々の種類の微生物もしくは他の動物や植物が混在していて、相互に単離できない微生物系の細胞内もしくは細胞のホモジネートなどの核酸測定に好適に適用できる。ここでいう微生物とは一般的にいう微生物のことで、特に限定されるものではない。例えば、真核微生物、原核微生物、その他、マイコプラズマ、ウイルス、リッケチャなどを挙げることができる。そして、特定配列を有する核酸とは、これらの微生物系において、例えば、どのように活躍しているのか調べたい菌株の細胞に特異性を有する核酸配列をもつ核酸のことである。例えば、特定菌株の5 S r RNA、16 S r RNAもしくは23 S r RNAまたはそれらの遺伝子DNAの特定配列である。

#### 【0020】

本発明において核酸プローブを複合微生物系または共生微生物系に添加し、特定菌株の5 S r RNA、16 S r RNAもしくは23 S r RNAまたはそれらの遺伝子DNAの量を測定することにより、当該系における特定菌株の存在量を測定することができる。なお、本発明においては、複合微生物系または共生微生物系のホモジネートに前記核酸プローブを添加して、ハイブリダイゼーション前後における蛍光色素の発光量の減少量を測定して特定菌株の存在量を測定する方法も、本発明の技術的範囲内とする。

#### 【0021】

前記の測定方法は、例えば、以下の如くである。すなわち、核酸プローブを添加する前に、複合微生物系または共生微生物系の温度、塩濃度、pHを前記の条件に調整する。複合微生物系または共生微生物系における特定菌株は、細胞数として $10^7 \sim 10^{12}$ 個/ml、好ましくは $10^9 \sim 10^{10}$ 個/mlに調整するが好適である。それは希釈、または遠心分離などによる濃縮などで行うことができる

。細胞数が $10^7$ 個/ml未満のときは、蛍光色の強度が弱く、測定誤差が大きくなる。 $10^{12}$ 個/mlを超えるとときは、複合微生物系または共生微生物系の蛍光強度が強すぎるため、特定微生物の存在量を定量的に測定することができなくなる。

## 【0022】

添加する核酸プローブの濃度は、複合微生物系または共生微生物系における特定菌株の細胞数に依存する。細胞数 $1 \times 10^8$ /mlに対して0.1~10.0 nM濃度、好ましくは1.0 nM濃度である。0.1 nM未満のときは、特定微生物の存在量を正確に反映したデータにならない。しかし、最適な核酸プローブの量は、細胞内のrRNA量に依存するために一概にはいえない。

## 【0023】

次に本発明において前記核酸プローブと特定菌株の5SrRNA、16SrRNAもしくは23SrRNAまたはその遺伝子DNAにハイブリダイゼーションさせるときの反応温度は、前記した条件と同様である。また、そのハイブリダイゼーションの時間も前記の条件と同様である。

前記のような条件で核酸プローブを特定菌株の5SrRNA、16SrRNAもしくは23SrRNAまたはその遺伝子DNAにハイブリダイゼーションさせる場合に、ハイブリダイゼーション前後の複合微生物系または共生微生物系の蛍光色素の発光の減少量を測定することになる。

## 【0024】

前記のようにして測定された蛍光色素の発光の減少量は、複合微生物系または共生微生物系における特定菌株の存在量と比例する。それは5SrRNA、16SrRNAもしくは23SrRNAまたはそれらの遺伝子DNAの量と特定菌株の存在量とが比例するからである。

## 【0025】

なお、本発明において、複合微生物系における微生物以外の成分は、本発明の核酸プローブと特定菌株の5SrRNA、16SrRNAもしくは23SrRNAまたはそれらの遺伝子DNAとのハイブリダイゼーションを阻害しない限り、および核酸プローブの蛍光色素の発光を阻害をしない限り、特に限定されない。

例えば、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ などのリン酸塩、硫酸、硝酸、尿素などの無機窒素類、マグネシウム、ナトリウム、カリウム、カルシウムなどのイオンの各種塩類、マンガン、亜鉛、鉄、コバルトなどの微量金属イオンの硫酸塩、塩酸、炭酸塩などの各種塩類、更にビタミン類などが適当に含まれていてもよい。もし、上記の阻害が観察される場合は、遠心分離などの操作で複数の微生物が混在する菌体を分離し、再び緩衝液系などに懸濁すればよい。

【0026】

上記の緩衝液としては、リン酸緩衝液、炭酸緩衝液、トリス・塩酸緩衝液、トリス・グリシン緩衝液、クエン酸緩衝液、グット緩衝液などの各種緩衝液をも用いることができる。緩衝液の濃度は、ハイブリダイゼーション、FRET現象、蛍光発色を阻害しない濃度である。その濃度は緩衝液の種類に依存する。緩衝液のpHは4~12、好ましくは5~9である。

【0027】

【実施例】

次に実施例および比較例を挙げて本発明を更に具体的に説明する。

実施例1

大腸菌 (*Escherichia coli*) の16SrRNAの5'末端から数えて335から358番目の核酸塩基配列にハイブリダイゼーションする、即ち、(3')CCGCTCACGCATC(5')の塩基配列を有する核酸プローブの調製を以下の通りに行った。

【0028】

核酸プローブの調製：(3')CCGCTCACGCATC(5')の塩基配列をもつオリゴヌクレオチドの3'末端のデオキシリボースのOH基に、 $-(\text{CH}_2)_7-\text{NH}_2$ を結合したものを、メドランド・サーティファイ・レージント・カンパニー社 (Midland Certified Reagent Company、米国) から購入した。更に、モレキュラープローブ (Molecular Probes) 社からフロオ・リポーターキット (FluoReporter Kits) F-6082 (ボデピーFLのプロピオン酸サクシニミジルエステル (BODIPY FL propionic acid succinimidyl esters) の他に、当該化合物をオリゴヌクレオチドのアミン誘導体に結合する試薬を含有するキット) を購入した。当該キ

ットを前記オリゴヌクレオチドに作用させて、本発明で使用するボデビーFL標識した核酸プローブを合成した。

【0029】

合成物の精製：得られた合成物を乾固し乾固物を得た。それを0.5M NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>緩衝液(pH9.0)に溶解した。当該溶解物をNAP-25カラム(ファルマシア社製)でゲルろ過を行い、未反応物を除去した。更に逆相HPLC(B gradient: 15~65%、25分間)を以下の条件で行った。そして、溶出するメインピークを分取した。分取した画分を凍結乾燥して、最初のオリゴヌクレオチド原料2mMより23%の収率で核酸プローブを得た。

【0030】

なお、上記の逆相クロマトグラフィーの条件は次の通りである：

溶出溶溶ベントA：0.05N TEAA 5%CH<sub>3</sub>CN

溶出溶溶ベントA：0.05N TEAA 40%CH<sub>3</sub>CN

カラム：CAPCEL PAK C<sub>18</sub>； 6×250mm

溶出速度：1.0ml/min

温度：40℃

検出：254nm

【0031】

実施例2

殺菌したニュートリエントブロス(NB)(Difco社製)液体培地50ml(組成：NB、0.08g/100ml)を含有する200ml容の三角フラスコを用いて、大腸菌JM109株を37℃で一晩振盪培養した。次に、本培養液に99.7%エタノールを当量添加した。このエタノール添加培養液2mlを2.0ml容量のエッペンドルフ遠心チューブで遠心分離し、菌体を得た。30mMリン酸緩衝液(ソーダ塩)(pH:7.2)100μlで菌体を一回洗浄した。菌体を130mMのNaCl含有の前記リン酸緩衝液100μlに懸濁した。当該懸濁液を氷冷中で40分間超音波処理し(出力：33w、発振周波数：20KHz、発振法：0.5秒発振、0.5秒休止)、ホモジネートを作製した。

【0032】

前記ホモジネートを遠心分離した後、上澄液を採取し蛍光光度計のセルに移した。それを36℃に温調した。それに36℃に予め加温した前記核酸プローブの溶液を最終濃度で5 nMとなるように添加した。36℃に温調しながら90分間大腸菌16S rRNAと核酸プローブとをハイブリダイゼーションさせた。そして蛍光光度計で蛍光色素の発光量を測定した。

### 【0033】

ハイブリダイゼーション前の蛍光色素の発光量は、上記の上澄液の代りに、130 mMのNaCl含有の30 mMのリン酸緩衝液（ソーダ塩）（pH: 7.2）を用いて測定した値を採用した。核酸プローブの量と上澄液の量の比を変えて発光量を測定した（励起光503 nm；測定蛍光色512 nm）。その結果を図1に示した。図1から分かるように、上澄液の量比が増加することにより発光量が減少することが分かる。即ち、本発明においては、核酸プローブにハイブリダイゼーションする標的核酸量に比例して、蛍光色素の発光の減少量の大きさが大きくなる事が分かる。

### 【0034】

#### 実施例 3

核酸プローブの調製：大腸菌JM109株の23S rRNAに特異的にハイブリダイゼーションする(5')CCCACATCGTTTTGTCTGGG(3')の塩基配列をもつオリゴヌクレオチドに3'末端のOH基に、 $-(CH_2)_7-NN_2$ を結合したものを、実施例1と同様にメドランド・サーティファイ・レージント・カンパニー社(Midl and Certified Reagent Company、米国)から購入した。更に、実施例1と同様にモレキュラプローブ(Molecular Probes)社からフロオ・リポーターキット(FluoReporter Kits) F-6083 (ボデピーTRMのプロピオン酸サクシニミジルエステル(BODIPY TRM propionic acid succinimidyl esters)の他に、当該化合物をオリゴヌクレオチドのアミン誘導体に結合する試薬を含有するキット)を購入した。当該キットを前記オリゴヌクレオチドに作用させて、ボデピーTMRで標識した核酸プローブを合成した。得られた合成物を実施例1と同様に精製して、最初のオリゴヌクレオチド原料2 mMより25%の収率でボデピーTMRで標識した核酸プローブを得た。



## 【0035】

## 実施例4

実施例2で得られた大腸菌JM109株の菌体を実施例2と同一の培地および培養条件で調製したシュードモナス・プウシモビルス 421Y株 (*Pseudomonas paucimobilis*) (現在名: スフィンゴモナス・プウシモビルス) (FERM P-5122) の菌体をOD660値で大腸菌JM109株と同濃度混合し、複合微生物系を調製した。得られた混合液(大腸菌JM109株の菌体濃度は実施例2と同一)について実施例2と同じ方法によりホモジネートを調製した。実施例3で調製した核酸プローブを用いて、励起光を543nm、また測定蛍光色を569nmにする以外は、実施例2と同様な実験を行った結果、実施例2と同様な結果を得た。

## 【0036】

## 【発明の効果】

前記ように本発明の核酸測定方法を用いると、測定系から未反応の核酸プローブを除く操作をすることがないので、標的核酸を短時間でかつ簡便に測定できる。また、複合微生物系または共生微生物系に適用すると、当該系における特定菌株の存在量を特異的かつ短時間に測定できる。

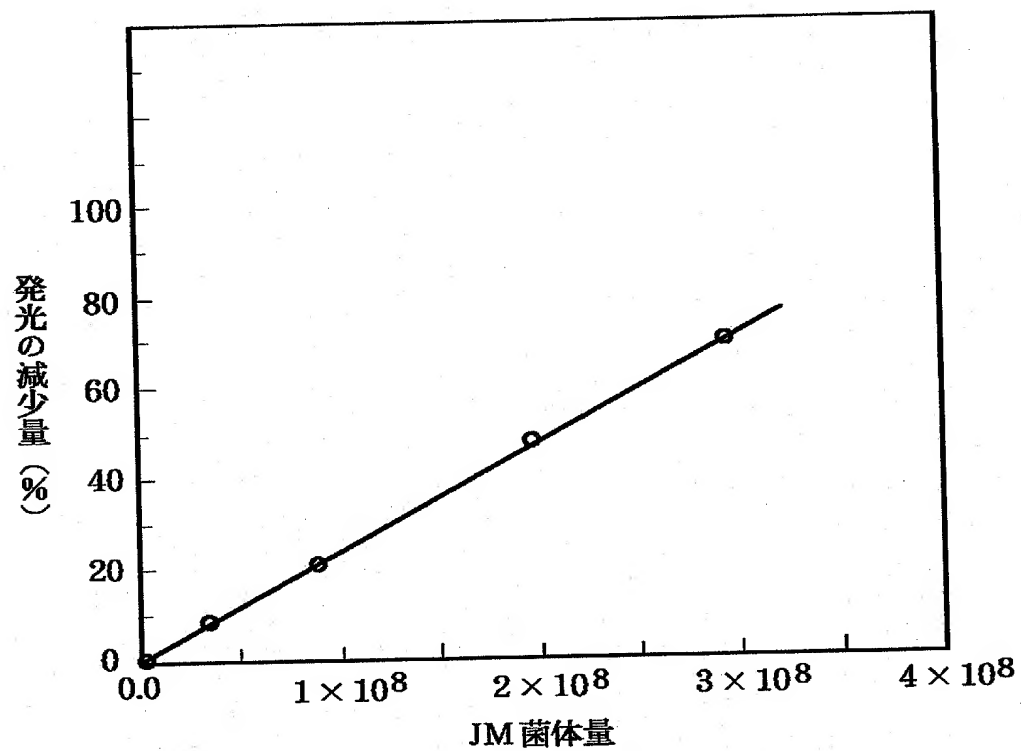
なお、本発明の方法は、液中における核酸全般の定量にかかわる方法であるので、定量的PCR法、核酸の $T_m$ 値の測定などにも応用可能である。よって本発明は、特定核酸配列の定量や本発明の実施例に示した微生物のrRNA定量のみに適用範囲が限定されるものではない。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】 実施例1で得た核酸プローブを用いて大腸菌 (*Escherichia coli*) の16SrRNAの5'末端から数えて335から358番目の核酸塩基配列を測定した場合の蛍光強度測定データを示す図。

【書類名】 図面

【図1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 蛍光色素で標識された核酸プローブを用いる核酸測定方法において、より短時間に、かつより簡便に目的の核酸量を測定できる方法を提供すること。

【解決手段】 蛍光色素で標識された核酸プローブを用いる核酸測定方法において、当該プローブを標的核酸にハイブリダイゼーションさせ、ハイブリダイゼーション前後における蛍光色素の発光の減少量を測定することを特徴とする核酸の新規測定方法。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	平成 11 年 特許願 第 111601 号
受付番号	59900374989
書類名	特許願
担当官	字留間 久雄 7277
作成日	平成 11 年 7 月 2 日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	597031070
【住所又は居所】	東京都中央区八丁堀 2-26-9
【氏名又は名称】	財団法人 バイオインダストリー協会

【特許出願人】

【識別番号】	000001144
【住所又は居所】	東京都千代田区霞が関 1 丁目 3 番 1 号
【氏名又は名称】	工業技術院長

【特許出願人】

【識別番号】	000156581
【住所又は居所】	東京都千代田区東神田一丁目 9 番 8 号
【氏名又は名称】	環境エンジニアリング株式会社

【指定代理人】

【識別番号】	220000404
【住所又は居所】	茨城県つくば市東 1-1-3
【氏名又は名称】	工業技術院生命工学工業技術研究所長

【代理人】

【識別番号】	100077698
【住所又は居所】	東京都千代田区神田佐久間町三丁目 30 番地 ア コスビル 201 号室 吉田特許事務所
【氏名又は名称】	吉田 勝広

【復代理人】

【識別番号】	100077698
【住所又は居所】	東京都千代田区神田佐久間町三丁目 30 番地 ア コスビル 201 号室 吉田特許事務所
【氏名又は名称】	吉田 勝広

【書類名】 手続補正書  
【提出日】 平成11年 5月13日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【事件の表示】  
    【出願番号】 平成11年特許願第111601号  
【補正をする者】  
    【識別番号】 000156581  
    【氏名又は名称】 環境エンジニアリング株式会社  
【代理人】  
    【識別番号】 100077698  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 吉田 勝広  
【ブルーフの要否】 要  
【手続補正 1】  
    【補正対象書類名】 明細書  
    【補正対象項目名】 発明の名称  
    【補正方法】 変更  
    【補正の内容】 1

特平 11-111601

【発明の名称】 核酸プローブを用いた核酸の新規測定方法

特平11-111601

出願人履歴情報

識別番号

[000001144]

1. 変更年月日

1990年 9月20日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区霞が関1丁目3番1号

氏 名

工業技術院長

特平 11-111601

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000156581]

1. 変更年月日

1996年 8月27日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都千代田区東神田一丁目9番8号

氏 名

環境エンジニアリング株式会社



特平11-111601

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[597031070]

1. 変更年月日

1997年 3月 5日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区八丁堀2-26-9

氏 名

財団法人 バイオインダストリー協会